



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07K 7/06, 7/08, A61K 37/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/02544 (43) Date de publication internationale: 20 février 1992 (20.02.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00657 (22) Date de dépôt international: 8 août 1991 (08.08.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/10236 10 août 1990 (10.08.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : AUNIS, Dominique [FR/FR]; 13, rue Saint-Erhard, F-67100 Strasbourg (FR). BADER, Marie-France [FR/FR]; 15, rue du Milieu, F-67200 Eckbolsheim (FR). GALINDO, Estelle [FR/FR]; 11, place des Meuniers, F-67000 Strasbourg (FR). ROMMAIN, Michèle [FR/FR]; Résidence Les Lions du Val, Peupliers 3 - 1, avenue Foch, F-95220 Herblay (FR). HELLE, Karen [NO/NO]; Avstadvien 19b, N-5000 Bergen (NO).	(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé & Phélip, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: PEPTIDES OF THE CHROMOSTATIN FAMILY (54) Titre: PEPTIDES DE LA FAMILLE DES CHROMOSTATINES (57) Abstract <p>Novel peptides of the chromostatin family having general formula $R_1-G-X_4-R-P-Q-A-X_5-P-R_2$, wherein R_1 may in particular be a residue of formula $S-D-E-D-S-D-$ or $-S-G-E-A-T-D-$ or $D-A-F-E-G-T-T-E-$; X_4 is a D, A or P residue; X_5 is an S, L or F residue; and R_2 may be a residue of formula $-G-L-G-P-G-P$ or $-E-P-K-Q-E-S$. The peptides can be used as drugs for treating diseases or disorders caused by a hypersecretion of catecholamines, corticoids or glucocorticoids, as well as diseases of a cardiovascular nature.</p> (57) Abrégé <p>Nouveaux peptides de la famille des chromostatines de formule générale (I): $R_1-G-X_4-R-P-Q-A-X_5-P-R_2$ dans laquelle R_1 peut représenter notamment, un résidu de formule: $S-D-E-D-S-D-$ ou $-S-G-E-A-T-D-$ ou $D-A-F-E-G-T-T-E-$; X_4 représente un résidu D, A ou P; X_5 représente un résidu S, L ou F; R_2 peut représenter un résidu de formule: $-G-L-G-P-G-P$, ou $-E-P-K-Q-E-S$. Application à titre de médicaments pour le traitement des affections ou troubles dus à une hypersecretion des catécholamines, des corticoïdes ou des glucocorticoïdes ainsi que des affections d'ordre cardiovasculaire.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

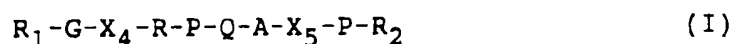
AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Caméroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

+ On ignore encore pour quels Etats de l'ancienne Union soviétique une désignation de l'Union soviétique déploie ses effets.

PEPTIDES DE LA FAMILLE DES CHROMOSTATINES

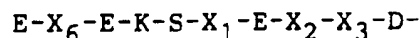
La présente demande concerne de nouveaux peptides de la famille des chromostatines , la préparation et l'application à titre de médicaments de ces nouveaux peptides .

La présente invention a ainsi pour objet de nouveaux peptides répondant à la formule générale (I):

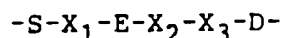


dans laquelle :

* R_1 représente un résidu de formule :



ou un résidu de formule



dans lesquelles :

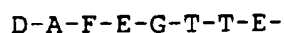
X_1 représente un résidu D ou G

X_2 représente un résidu D ou A

X_3 représente un résidu S ou T

X_6 représente un résidu V ou A

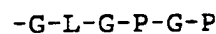
ou R_1 représente un résidu de formule :



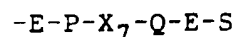
* X_4 représente un résidu D, A ou P

* X_5 représente un résidu S, L ou F

* R_2 représente un résidu de formule :



ou de formule



dans laquelle X_7 est un résidu M ou K.

De manière préférentielle , les peptides

tels que définis précédemment sont tels que :

R_1 représente un résidu de formule :

E-V-E-K-S-D-E-D-S-D- ou S-D-E-D-S-D-

R_2 représente un résidu

5 -G-L-G-P-G-P

De tels peptides peuvent répondre à la formule (II) correspondant à la chromostatine bovine:

S-D-E-D-S-D-G-D-R-P-Q-A-S-P-G-L-G-P-G-P

10 Un autre mode de réalisation préférentiel de l'invention est celui dans lequel les peptides répondent à la formule (I) dans laquelle :

R_1 représente un résidu de formule

S-G-E-A-T-D-

15 et R_2 représente un résidu de formule :

-E-P-M-Q-E-S

auquel cas le peptide peut répondre à la formule (III), correspondant à la chromostatine humaine :

S-G-E-A-T-D-G-A-R-P-Q-A-L-P-E-P-M-Q-E-S-

20 Un autre cas de peptides répondant à la formule (I) est celui dans lequel :

R_1 représente le résidu de formule :

D-A-F-E-G-T-T-E-

25 auquel cas le peptide peut répondre à la formule (IV) correspondant à la chromostatine de rat :

D-A-F-E-G-T-T-E-G-P-R-P-Q-A-F-P-E-P-K-Q-E-S

La présente invention est en outre relative aux fragments des peptides décrits ci-dessus .

30 L'invention a également pour objet un procédé de préparation des peptides ou fragments tels que définis ci-dessus , caractérisé en ce que l'on effectue une synthèse en phase solide en introduisant séquentiellement sur un support de type polystyrène

réticulé les amino-acides dûment protégés à l'aide d'un agent de couplage , on déprotège les amino-acides, et on libère de la résine la chaîne peptidique ainsi formée pour obtenir le peptide ainsi recherché.

5 Dans des conditions préférentielles de mise en oeuvre , le procédé ci-dessus décrit est caractérisé en ce que :

- le support de type polystyrène réticulé est une résine de type "Boc-AA-CM" dans laquelle Boc
10 est un groupement tertibutyloxycarbonyl , AA est le premier amino-acide et CM désigne le support de polystyrène réticulé , ou

- l'agent de couplage est le (benzotriazol-
1-yloxy) tris (diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate ou BOP, ou
15

- la libération du support de la chaîne peptidique ainsi que la déprotection des amino-acides sont effectuées au moyen de l'acide fluorhydrique en opérant à basse température de préférence vers 0°C.

20 Les peptides , ou fragments , selon la présente invention présentent de très intéressantes propriétés pharmacologiques ; on note en particulier des propriétés anticatécholamines et une activité dans le domaine cardiovasculaire en particulier une action
25 décontracturante des parois veineuses a aussi été observée .

Ces propriétés sont illustrées plus loin dans la partie expérimentale .

L'invention a aussi pour objet l'utilisation
30 des nouveaux peptides ou de fragments répondant à la formule (I) ci-dessus à titre de médicaments .

On retiendra particulièrement à titre de médicaments les peptides répondant aux formules (II), (III) ou (IV) .

5 Ces médicaments trouvent , par exemple , leur emploi dans le traitement des pathologies se situant dans le cadre d'une hypersecrétion des catécholamines et des corticoïdes , notamment dans les situations de stress, dans l'ulcère gastrique, dans l'hypertension artérielle et lors de poussées
10 hypertensives chez les malades porteurs de tumeurs de type phéochromocytome sécrétant .

Ces médicaments peuvent aussi être utilisés pour lutter contre les effets secondaires des glucocorticoides ; ils permettent de lutter également
15 contre les troubles dus à une hypersécrétion de glucocorticoides et notamment contre le vieillissement en général et plus particulièrement contre l'hypertension , le glaucome , l'athérosclérose , l'ostéoporose, le diabète , l'obésité ainsi que la
20 dépression de l'immunité et l'insomnie . Ces médicaments peuvent aussi être utilisés dans le domaine cardiovasculaire et en particulier en vue d'une action décontracturante des parois veineuses.

La dose usuelle , variable selon le produit
25 utilisé, le sujet traité et l'affection en cause peut être par exemple de 0,1 à 10 mg par jour par voie intraveineuse chez l'homme .

L'invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques qui renferment au moins
30 un peptide ou fragment précité à titre de principe actif .

A titre de principe actif , les peptides répondant à la formule générale (I) , peuvent être

incorporés dans des compositions pharmaceutiques destinées à la voie digestive ou parentérale .

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être, par exemple , solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine , comme par exemple ,
5 les comprimés simples ou dragéifiés , les gélules , les capsules , les granulés , les suppositoires , les préparations injectables , les aérosols ; elles sont
10 préparées selon les méthodes usuelles . Le ou les principes actifs peuvent être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques , tels que le talc, la gomme arabique , le lactose , l'amidon, le stéarate de
15 magnésium , le beurre de cacao , les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale , les dérivés paraffiniques , les glycols , les divers agents mouillants , dispersants ou émulsifiants , les conservateurs .

20 Il va être donné maintenant à titre non limitatif , des exemples de mise en oeuvre de l'invention dans lesquels :

- Les figures 1A et 1B représentent des familles d'enregistrement des courants obtenus par la
25 technique de "patch-clamp " en absence (1A) et en présence (1B) de peptide . Les nombres indiqués sur les courbes indiquent les potentiels de membrane appliqués.

- les figures 1C et 1D sont des courbes
30 illustrant les relations entre les potentiels de membrane (en abscisse) et l'intensité des courants (en ordonnée) . La figure 1C montre en absence de peptide l'évolution des relations intensité /potentiel

à 9 minutes d'intervalle dans une cellule témoin . La figure 1D montre l'évolution des relations intensité/potentiel avant l'addition de peptide et 9 minutes après l'addition .

5 - la figure 1E illustre l'évolution du rapport entre le courant rentrant mesuré à un temps donné et le courant rentrant mesuré 10 minutes après la liaison cellule-pipette .(Ipic/Ipic (3 min.)) .

10 La figure 2A est une courbe montrant l'évolution de la quantité de chromostatine synthétique de bovin liée aux cellules chromaffines en fonction de concentration en chromostatine .

15 La figure 2B montre la relation entre le rapport chromostatine liée/libre (en ordonnée) et la concentration de chromostatine liée .

20 La figure 3A illustre l'effet sur la liaison de la chromostatine synthétique de bovin iodée (peptide de l'exemple 2) par de la chromostatine synthétique humaine (hChS) ou ses fragments de 20 ou 24 acides aminés (Ch S 20 ou 24 aa) , par de la chromogranine A (CGA) , de la chromostatine synthétique de rat (Ch S rat) , par de la pancréastatine , ou encore par le CAP 14 . Le pourcentage de liaison de la chromostatine de bovin iodée liée est exprimée en ordonnée , la concentration en peptide en abscisse .

25 La figure 3B illustre l'effet de la chromostatine bovine , en présence des peptides cités dans la figure 3A , sur la libération de catécholamine par les cellules chromaffines . Les résultats sont exprimés par rapport à la libération en absence de chromostatine .

30

La figure 4A est une photographie d'un gel d'électrophorèse mono-dimensionnel . Les puits 1 à 4 et 5 à 7 correspondent respectivement aux fractions membranaire et soluble . Les concentrations en chromostatine bovine (ChS) sont indiquées en μ M.

La figure 4B est un autoradiogramme du gel de la figure 4A. Sur ces deux figures le poids moléculaire (Mr) est indiqué en kD.

La figure 4C est un histogramme indiquant le pourcentage de radioactivité par rapport au témoin , des puits correspondants .

La figure 5 est un histogramme illustrant l'effet de diverses concentrations (2;20 et 200 nM) de chromostatine humaine (h Chr S) , du fragment N-terminal du CGA (bN22) à 35 nM ou du fragment 1-40 du CGA (bLE-40) à une concentration sensiblement supérieure à 100 nM, sur la contraction de fragments de veine saphène en réponse à une concentration 80 mM en K .

EXEMPLE 1 : Préparation de peptide de formule :
E-V-E-K-S-D-E-D-S-D-G-D-R-P-Q-A-S-P-G-L-G-P-G-P
Stade A : Assemblage de la chaîne peptidique .

On utilise un support de type "Boc-Pro-CM-support" dans lequel Boc est un groupement tertibutyloxycarbonyl , Pro représente un groupement proline et CM-support désigne le support de polystyrène réticulé .

Le support renfermant 0,6 mmol Trp/g a été préparé selon la technique décrite par Plaue S. et Heissler D. [(1987) Tetrahedron Letter 18, 1401] .

Tous les aminoacides sont N-protégés par le groupement tertibutylcarbonyl , les groupements

La figure 4A est une photographie d'un gel d'électrophorèse mono-dimensionnel . Les puits 1 à 4 et 5 à 7 correspondent respectivement aux fractions membranaire et soluble . Les concentrations en chromostatine bovine (ChS) sont indiquées en μ M.

La figure 4B est un autoradiogramme du gel de la figure 4A. Sur ces deux figures le poids moléculaire (M_r) est indiqué en kD.

La figure 4C est un histogramme indiquant le pourcentage de radioactivité par rapport au témoin , des puits correspondants .

La figure 5 est un histogramme illustrant l'effet de diverses concentrations (2;20 et 200 nM) de chromostatine humaine (h Chr S) , du fragment N-terminal du CGA (bN22) à 35 nM ou du fragment 1-40 du CGA (bLE-40) à une concentration sensiblement supérieure à 100 nM, sur la contraction de fragments de veine saphène en réponse à une concentration 80 mM en K .

EXEMPLE 1 : Préparation de peptide de formule :
E-V-E-K-S-D-E-D-S-D-G-D-R-P-Q-A-S-P-G-L-G-P-G-P
Stade A : Assemblage de la chaîne peptidique .

On utilise un support de type "Boc-Pro-CM-support" dans lequel Boc est un groupement tertibutyloxycarbonyl , Pro représente un groupement proline et CM-support désigne le support de polystyrène réticulé .

Le support renfermant 0,6 mmol Trp/g a été préparé selon la technique décrite par Plaue S. et Heissler D. [(1987) Tetrahedron Letter 18, 1401] .

Tous les aminoacides sont N-protégés par le groupement tertibutylcarbonyl , les groupements

protecteurs des chaînes latérales ont été les suivants:

- ester de cyclohexyl pour l'acide aspartique ,
- benzyl pour la sérine ,
- 5 - o-chlorobenzoyloxycarbonyl pour la lysine ,
- tosyl pour l'arginine .

Les réactions de couplage ont été effectuées en utilisant le BOP ou (benzotriazol-1-yloxy tris (diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate .

10 Un cycle de couplage peut être résumé comme suit :

Déprotection :

1 - Traitement avec une solution d'acide trifluoroacétique (50 %) dans le dichlorométhane contenant 3 % d'éthanedithiol pendant 1 minute .

15 2 - Vidange puis traitement avec une solution d'acide trifluoroacétique à 50% dans le dichlorométhane contenant 3 % d'éthanedithiol pendant 30 minutes .

20 3 - Vidange puis lavage avec de l'isopropanol contenant 5 % d'éthanedithiol.

4 - Lavage au dichlorométhane , 2 fois .

Couplage :

1 - Addition de BOP et de Boc-acide aminé .

25 2 - Addition de diisopropyléthylamine (6 équivalents) puis de solvant (dichlorométhane ou diméthylformamide) sous agitation .

3 - Après réaction négative à la ninhydrine lavage 2 fois au dichlorométhane .

30 Les tests de contrôle utilisant la ninhydrine ont été effectués suivant le procédé décrit par Kaiser, E., Colescott, R.L. , Bossinger, C.D. et Cook , P.I. (1970 Anal. Biochem. 24, 595-598) .

Avant le traitement par l'acide fluorhydrique le dernier groupement Boc est éliminé par l'acide trifluoroacétique .

5 Au départ de 2 g de résine " Boc-Lys-CM-résine" on a ainsi obtenu en opérant manuellement 5,25 g de complexe chaîne peptidique protégée, résine que l'on utilise directement au stade suivant .

Stade B : Libération du complexe chaîne peptidique protégée - résine .

10 On fait réagir 1,5 g de complexe chaîne peptidique protégée-résine pendant 60 minutes avec 15 ml d'acide fluorhydrique à 0°C en présence d'anisole (1 ml) et de diméthylsulfide (0,5 ml) . La résine est lavée à l'éther ; le peptide brut est extrait par une
15 solution aqueuse d'acide acétique à 20 %. Après lyophilisation , on obtient 660 mg de produit brut non cyclisé que l'on utilise directement au stade suivant.

STADE C : Cyclisation et purification .

20 On dissout 500 mg du peptide brut obtenu ci-dessus , dans 250 ml d'eau , on agite vigoureusement , ajoute de la diisopropyléthylamine jusqu'à obtention d'un pH 8 . Une goutte de mélange est recueillie toutes les heures et ajoutée à une goutte d'une
25 solution contenant de l'acide dithiobis (2-nitrobenzoïque) dans un tampon molaire de K₂HPO₄ (pH 8) pour suivre la réaction d'oxydation .

30 Pendant toute la réaction on maintient le pH à 8 par addition de diisopropyléthylamine . La réaction est suivie par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Après 28 heures , on constate l'absence de coloration jaune dans le test à l'acide dithiobis (2-nitrobenzoïque).

Le produit obtenu est purifié par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur colonne Whatman M20 ODS₃ et élué par un mélange eau-acétonitrile renfermant 0,1 % d'acide trifluoroacétique.

On lyophilise la fraction obtenue et on recueille finalement 30 mg de produit attendu .

EXEMPLES 2 et 3.

En opérant de la même manière qu'à l'exemple 1 mais avec d'autres amino-acides , on a préparé les deux autres peptides qui figurent ci-après :

EXEMPLE 2: Peptide de formule :

S-D-E-D-S-D-G-D-R-P-Q-A-S-P-G-L-G-P-G-P

Ce peptide peut être marqué à l'iode en utilisant la technique de Bolton & Hunter [(1973) , Biochem J. 133, 529-539] . On obtient une activité spécifique d'environ 200 Ci/mme . Le peptide ainsi marqué est purifié sur une colonne SEP-PAK C₁₈ à l'aide d'un gradient d'acide acétonitrile et d'eau .

EXEMPLE 3: Peptide de formule :

E-A-E-K-S-G-E-A-T-D-G-A-R-P-Q-A-L-P-E-P-M-Q-U-E-S

EXEMPLE 4:

On a préparé un soluté injectable répondant à la formulation suivante :

- Produit de l'exemple 1	1 mg
- excipient aqueux stérile	2 ml.

EXEMPLE 5-

On a préparé des comprimés répondant à la formule suivante :

- Produit de l'exemple 1	2 mg
- excipient q.s.p. un comprimé terminé à	150 mg

(composition de l'excipient : lactose, amidon, talc, stéarate de magnésium).

ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES PRODUITS .

A) Des cellules chromaffines en culture ont été préincubées 10 minutes avec les produits étudiés . Les cellules ont alors été stimulées par la carbamylcholine (analogue de l'acétylcholine) 0,5 mM ou dépolarisées directement par du potassium 59 mM.

Les résultats obtenus avec les produits des exemples figurent dans le tableau I ci-après .

Le composé de l'exemple 2 produit une inhibition dose-dépendante de la libération des catécholamines dans la zone de concentration comprise entre 10^{-9} et 10^{-6} M. La valeur ID_{50} a été pratiquement déterminée à 5×10^{-9} M . Le composé de l'exemple 1 produit une courbe similaire à l'exemple 2 avec un ID_{50} également voisin .

B) Par ailleurs , ces expériences ont été complétées par la mesure des entrées de calcium extracellulaire dans l'espace intracellulaire , en mesurant après 30 secondes de stimulation avec 0,5 mM de carbamyl-choline ou 59 mM de potassium , l'accumulation de $^{45}Ca^{++}$.

25	Produits étudiés	Accumulation de $^{45}Ca^{++}$ (pmol/30 sec/ 10^6 cellules) Carbamyl-choline K^+ 59 mM
----	------------------	---

30	Témoin		3,34 (0%)	4,20 (0%)
	Exemple 2	10^{-6}	0,19 (94,4%)	0,85 (80 %)

Entre parenthèses , sont portés les pourcentages d'inhibition .

Ces résultats montrent que le composé de l'exemple 2 bloque l'entrée de calcium provoqué soit par la carbamylcholine soit par une concentration dépolarisante de potassium, l'inhibition atteignant 86 ou 77 % respectivement. Ceci suggère que l'inhibition de la libération des catécholamines est la conséquence d'une réduction des flux de calcium au travers des canaux calcium sensibles au voltage de ces cellules excitables .

Des expériences complémentaires ont montré une absence d'effets sur les canaux sodium sensibles au voltage de la même cellule .

C) Dans ces expériences , la libération des catécholamines est suivie en temps réel en mesurant les catécholamines par la technique électrochimique en continu à partir d'une suspension cellulaire incubée dans une chambre de perfusion.

Les cellules sont stimulées en fournissant des impulsions successives de 1,1-diméthyl-4-phényl-pipérazinium-iodure , en présence de 1 micromole de composé de l'exemple 2. Les impulsions répétées induisent une désensibilisation progressive des réponses cellulaires. En présence de composé de l'exemple 2, on assiste à une inhibition de 40% du premier pic de sécrétion obtenu en stimulant les cellules avec le pipérazinium, puis on observe une inhibition complète des réponses sécrétoires successives . L'élimination du peptide permet un retour à la normale , mais qui prend un temps très long , puisque après 10 mn, on ne retrouve que 31% des valeurs des témoins . Ces résultats indiquent que ces peptides exercent une inhibition prolongée dans le temps de l'activité sécrétrice des cellules

chromaffines et qu'ils accentuent aussi de façon spectaculaire le processus de désensibilisation de la réponse sécrétoire.

5 D) Effet du peptide de l'exemple 2 sur les courants de calcium dépendant du potentiel de membrane.

Des cellules chromaffines ont été isolées et cultivées comme décrit précédemment (Galindo et al. (1991) , Proc. Natl. Acad. Sci.USA 88,1426-1430 ;
10 Bader et al , (1986) J. Biol. Chem. 261, 5777-5783) jusqu'à une densité de 250.000 cellules par puits .

Les cellules sont ensuite transférées dans une solution ayant la composition suivante : Choline Cl, 140 mmol/l , KCl5 mmol/l ; CaCl₂ 2,5 mmol/l;
15 MgCl₂; 1 mmol/l ; Hepes 10 mmol/l ; glucose 11 mmol/l pH 7,4.

L'expérience est menée comme décrit par Horn et Marty (1988, J. Gen. Physiol, 92;145-159).

Une liaison ayant une résistance importante
20 (supérieure à 20 G Ω) est obtenue dans la cellule de mesure (la résistance de la tête de la pipette est de 5 M Ω).

La composition ionique de la pipette est quant à elle la suivante : CsCl 70 mmol/l ; aspartate
25 de césium 70 mmol/l ; CaCl₂ 1 mmol/l ; EGTA 11 mmol/l; MgCl₂ 1 mmol/l ; Mg-ATP 2,5 mmol/l ; Hepes 10 mmol/l; nystatine 200 μ g/ml ; pH 7,2 .

Les fluctuations de capacité ont été supprimées de manière connue et le potentiel de la
30 pipette a été fixé à - 80 mV.

Après 2 ou 3 minutes , une petite fluctuation de capacité indiquant la continuité électrique entre l'intérieur de la cellule et la

solution de la pipette est observée . La taille de la fluctuation se stabilise environ 5 minutes après formation de la liaison entre la cellule de mesure et la pipette .

5 Des familles d'enregistrement ont été obtenues 10 minutes après la formation de la liaison et ont été répétées toutes les trois minutes durant 15 minutes. Les fluctuations de courant ont été éliminées toutes les cinq secondes par des phases de
10 dépolarisation (10 mV , 60 msec) .

La méthode utilisant la nystatine a été appliquée afin d'enregistrer la totalité des courants cellulaires de Ca^{2+} dans les cellules chromaffines . Cette technique a pour avantage de ne pas provoquer la
15 fuite des protéines et des petits métabolites du cytoplasme . D'autre part , les courants membranaires restent stables durant plus d'une heure .

La dépolarisation des cellules chromaffines à partir d'un potentiel de -80 mV dans des étapes de
20 dépolarisation de 10 mV induit l'activation des canaux de Ca^{2+} dépendants de la tension . On observe sur la figure 1A de manière claire un courant de Ca^{2+} vers l'intérieur .

L'amplitude et la cinétique de ce courant de
25 Ca^{2+} ne change pas de manière substantielle en fonction du temps jusqu'à 30 minutes après établissement d'une continuité électrique entre l'intérieur de la cellule et la solution de la pipette.

30 Après introduction du peptide , à une concentration de 1 μM , on observe une réduction de l'amplitude du courant vers l'intérieur qui diminue jusqu'à une valeur d'environ 50% de celle obtenue

avant l'introduction du peptide , comme le montre la figure 1B.

Les résultats de la figure 1B ont été obtenus sur la même cellule que ceux de la figure 1A.

5 Les résultats de la figure 1B sont enregistrés 9 minutes après introduction du peptide .

La dépendance vis-à-vis du temps de l'action inhibitrice du peptide est due au temps nécessaire pour la diffusion de ce peptide .

10 Le peptide est introduit dans la cellule sous la forme d'une solution aqueuse en utilisant la micro-pipette . L'introduction de volume similaire de fluide ne comprenant pas le peptide n'affecte pas les courants cellulaires de Ca^{2+} .

15 La figure 1C montre que durant la période de diffusion ,il n'y a pas de diminution significative de l'amplitude due au courant de Ca^{2+} en absence de peptide . Sur cette figure, les cercles ouverts représentent le courant obtenu 16 minutes après la
20 liaison cellule-pipette . Les triangles représentent le courant obtenu 25 minutes après la formation de cette liaison .

Cependant , l'addition du peptide à une concentration de 1 μM au bain induit une importante
25 diminution du pic du courant de tous les potentiels de membrane étudiés comme le montre la figure 1D. Sur cette figure , les cercles ouverts correspondent au courant obtenu en absence de peptide 16 minutes après formation de la liaison, le peptide étant ajouté à la
30 17ième minute . Les cercles fermés représentent le courant obtenu 25 minutes après la formation de la liaison c'est-à-dire 8 minutes après l'addition du peptide au bain.

Il en résulte que la conductance diminue de 5,8 nS en l'absence de peptide et de 3,2 nS en sa présence.

5 Le temps d'action de l'effet inhibiteur du peptide a été étudié en répétant les mesures toutes les 3 minutes aussi bien pour le témoin que pour les cellules traitées par le peptide . Le rapport entre le courant maximum rentrant obtenu à tout instant et le courant maximum rentrant obtenu 3 minutes après la
10 liaison de la cellule à la pipette a été mesuré .

Ce rapport est significatif de la diminution du courant de Ca^{2+} en fonction du temps . Comme le montre la figure 1E , le rapport n'est pas modifié de manière substantielle dans le cas des cellules non
15 traitées et reste proche de 1 (cercles vides) . Cependant , l'addition du peptide (cercles pleins) entraîne une diminution marquée de ce rapport, indiquant que le peptide bloque les courants de Ca^{2+} dépendant de la tension de type L dans les cellules
20 chromaffines . La flèche indique le moment d'addition du peptide .

E) Liaison du peptide sur la membrane plasmatique des cellules chromaffines .

25 Des cellules chromaffines (250.000 cellules par puits) ont été lavées à l'aide de la solution de Locke et incubées avec la microprotéine iodée en présence de diverses concentrations de microprotéines non marquées ou diverses concentrations de peptides dérivés du CGA.

30 Les expériences sont effectuées dans 0,5 ml de solution de Locke contenant 0,25 % de sérum albumine bovine . L'état d'équilibre est atteint après une incubation de deux heures à 15°C . Le tampon de

liaison est éliminé en fin de réaction , les cellules étant lavées trois fois avec de la solution de Locke. La radioactivité restante associée aux cellules est mesurée à l'aide d'un compteur .

5 Comme indiqué sur la figure 2A , les courbes de liaison indiquent la présence d'un site simple ayant un K_d d'environ 6,51 nM , et un B_{max} de 2,7 pmol/mg de protéine . La valeur K_D est comparable à la concentration inhibant de 50 % la libération de
10 catécholamine comme indiqué en B) ou comme calculé à partir de la figure 3B .

Le peptide iodé de l'exemple 2 montre donc un haut degré de spécificité de liaison vis-à-vis des cellules chromaffines mais pas vis-à-vis des cellules
15 du type endothélial ou fibroblastique présentes dans la culture , puisque le traitement des cultures avec de la 6-hydroxy dopamine ou des ensemencements différentiels induisent une disparition complète de la liaison spécifique .

20 Cette liaison est indépendante du calcium mais diminue de 70% quand la concentration en magnésium externe est réduite de 2,5 mM à 0 .

De plus , la liaison est très dépendante du pH atteignant un maximum pour un pH de 7,5 et montrant
25 une réduction importante avec des changements aussi faibles que 0,5 unité de pH .

Ces résultats sont résumés sur les figures 2A et 2B .

30 F) Spécificité de la liaison du peptide de l'exemple 2.

La spécificité de liaison de la microprotéine de l'exemple 2 a été testée sur des cellules chromaffines intactes en déplaçant la

microprotéine iodé par des peptides dérivant de la CGA.

Comme montré sur la figure 3A , la liaison du peptide iodé n'est pas affectée par l'augmentation des concentrations de pancréastatine , de CAP. 14, qui a une séquence peptidique hautement conservée correspondant aux acides aminés 316-329 de la séquence du CGA bovin , et de la chromostatine synthétique de rat.

Par contre , le composé iodé de l'exemple 2, ou chromostatine bovine est déplacé par la chromostatine bovine ainsi que par de la chromostatine bovine à laquelle on a ajouté les quatre acides aminés EVEK à son extrémité N-terminale .

Ces résultats sont à mettre en relation avec le fait que ni la pancréastatine , ni le CAP 14 , ni la chromostatine de rat sont capables de moduler la libération de catécholamine à partir de cellules chromaffines de bovins , tandis que , aussi bien la chromostatine bovine que la chromostatine bovine allongée inhibent de manière forte la sécrétion comme le montre la figure 3B.

Curieusement , la chromostatine humaine qui est identique à 50% à la chromostatine bovine et qui possède une région hautement conservée de 6 acides aminés dans sa séquence interne déplace la chromostatine bovine iodée avec un IC 50 de 50 nM (figure 3 A). De plus , comme le montre la figure 3 , la CGA native qui a une activité biologique d'environ 100 fois inférieure à celle de la chromostatine en ce qui concerne la libération de catécholamine (ID 50= 600 nM) , déplace la chromostatine iodée bovine avec une efficacité 100 fois moindre (IC 50=480 nM) que la chromostatine bovine .

La liaison de la chromostatine iodée bovine n'est affectée ni par des peptides non liés aux CGA tels que la substance P ou l' enkephaline ni par le 1,1 - diméthyl-4-phényl-pipérazinium et l'apomorphine, ce qui exclut la possibilité d'interférence de la chromostatine avec les récepteurs nicotinique ou dopaminergique présents sur les cellules chromaffines.

G) Expériences de couplage entre le peptide et son récepteur .

Des cellules chromaffines cultivées à une densité de 500.000 cellules par puits , puis privées de sérum de fœtus de veau durant 24 heures , sont lavées et incubées durant deux heures à 15°C avec de la chromostatine bovine iodée dans de la solution de Locke contenant une concentration de chromostatine non marquée en l'absence d'acide ascorbique et de sérum d'albumine bovine . Les cellules sont ensuite lavées de manière à enlever la chromostatine non liée et sont incubées durant 20 minutes à température ambiante avec 20 mM de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminepropyl) carbodiimide (EDC) .

La réaction de couplage est arrêtée par lavage rapide des cellules avec une solution 50 mM Tris (pH 7,6) et 160 mM NaCl .

Les cellules sont ensuite homogénéisées et centrifugées à 55 rpm durant 30 minutes de façon à séparer les membranes des fractions solubles . Les deux échantillons sont solubilisés dans du sodium dodécylsulfate (SDS) et analysés sur un gel d'électrophorèse en polyacrylamide à 12 %. La radioactivité est ensuite quantifiée sur le gel séché.

Ces expériences de couplage ont été effectuées de manière à déterminer la masse

moléculaire du site de liaison de la chromostatine .
L' EDC est utilisé pour lier la chromostatine iodée à son récepteur .

5 Les figures 4A, 4B , 4C correspondent respectivement à l'électrophorèse en gel monodimensionnel , à l'autoradiographie , et au calcul de radioactivité associé aux protéines marquées .

10 On observe que les groupements aminés de la chromostatine iodée sont bloqués . Le couplage se fait donc par l'intermédiaire des six groupements carboxyliques présents le long du peptide (4 groupements aspartique , 1 groupement glutamique et 1 groupement proline) .

15 On remarque sur la figure 4B , une bande unique correspondant à un composant d'un poids moléculaire d'environ 80 kD . Cette bande n'est pas détectable quand les cellules sont pré-incubées avec un excès de chromostatine avant l'incubation avec la chromostatine iodée . De plus , la présence de
20 chromostatine dans le milieu extra-cellulaire dans des concentrations déplaçant la liaison de haute affinité de la chromostatine iodée (figure 3A) fait décroître de manière progressive le marquage de la bande de 80 kD (Figures 4B , 4C) .

25 Le traitement pepsique des cellules dans des conditions qui ne détachent pas les cellules cultivées conduit à une disparition complète de la radioactivité correspondant à la bande 80 kD . Ceci confirme que le site de liaison pour la chromostatine iodée est une
30 protéine membranaire .

H) Effet des produits selon l'invention sur les contractures indépendantes des ions Ca^{2+} dans des fragments de veine saphène .

Les fragments de veine saphène sont enrobés d'endothélium .

Dans ces fragments , 45 à 55 % de la contraction en présence de concentrations importantes en ion potassium (80 mM) persiste dans un milieu sans calcium en présence d'EDTA à 1 mM .

Quand ces fragments sont pré-incubés durant 15 minutes en présence de fragments de CGA dans un milieu sans calcium , mais contenant de l'EDTA , la réponse au potassium est très inhibée par rapport au témoin . Ce phénomène est observé aussi bien avec la chromostatine humaine qu'avec l'extrémité N-terminale du CGA (extrémité 1 - 40). Une incubation avec 1 μ M de nifedipine inhibe totalement la contraction en réponse à des concentrations de potassium importantes, aussi bien des milieux sans calcium que dans milieux contenant du calcium . Ceci indique qu'il existe dans le réticulum sarcoplasmique et les membranes cellulaires des canaux sensibles à la tension.

Ces résultats montrent qu'il existe un effet de la chromostatine humaine sur la veine saphène humaine , et que cet effet est une inhibition de la libération d'ions calcium intracellulaires .

Ces résultats sont résumés sur la figure 5 dans laquelle bN-22 représente l'extrémité N-terminale de la CGA contenant la chromostatine bovine , bLE-40 représente la séquence 1-40 de la CGA , et hChrS représente la séquence 124-143 de la chromostatine humaine .

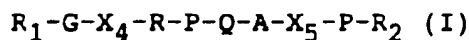
TABLEAU I

Produits étudiés	% de Noradrénaline libérée cellulaire Carbamyl-choline	K + 59 mM
Témoin	25 ± 0,8 (0 %)	20,2 ± 0,7 (0 %)
Chromogranine A 10 ⁻⁶ M	6,3 ± 1,0 (75%)	11,6 ± 0,9 (43%)
Exemple 2 10 ⁻⁶ M	3,8 ± 0,8 (85%)	9,3 ± 0,9 (54%)
Exemple 1 10 ⁻⁶ M	4,4 ± 1,0 (83%)	7,7 ± 0,2 (62%)

Entre parenthèses sont portés les pourcentages d'inhibition .

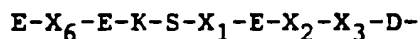
REVENDICATIONS

1. Nouveaux peptides répondant à la formule générale (I) :

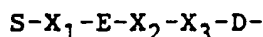


5 dans laquelle :

* R_1 représente un résidu de formule :



ou un résidu de formule



10 dans lesquelles :

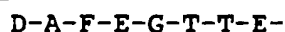
X_1 représente un résidu D ou G

X_2 représente un résidu D ou A

X_3 représente un résidu S ou T

X_6 représente un résidu V ou A

15 où R_1 représente un résidu de formule :



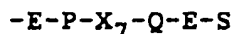
* X_4 représente un résidu D, A ou P

* X_5 représente un résidu S, L ou F

* R_2 représente un résidu de formule :

20 $-G-L-G-P-G-P$

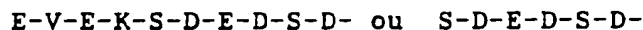
ou de formule



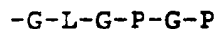
dans laquelle X_7 est un résidu M ou K.

25 2. Peptides selon la revendication 1, caractérisés en ce que :

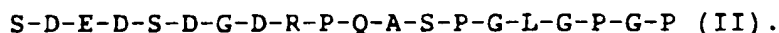
R_1 représente un résidu de formule



R_2 représente un résidu



30 3. Peptides selon l'une des revendications 1 ou 2 répondant à la formule :



4. Peptides selon la revendication 1 ,
caractérisés en ce que :

R₁ représente un résidu de formule :

E-A-E-K-S-G-E-A-T-D- et

5 R₂ représente un résidu de formule :

-E-P-M-Q-E-S.

5. Peptides selon la revendication 1 ,
répondant à la formule (I) dans laquelle:

R₁ représente un résidu de formule

10 S-G-E-A-T-D- et R₂ représente un résidu de
formule :

- E-P-M-Q-E-S.

6. Peptides selon la revendication 5
répondant à la formule :

15 S-G-E-A-T-D-G-A-R-P-Q-A-L-P-E-P-M-Q-E-S- (III).

7. Peptides selon la revendication 1,
caractérisés en ce que :

R₁ représente le résidu de formule :

D-A-F-E-G-T-T-E .

20 8. Peptides selon la revendication 7
répondant à la formule :

D-A-F-E-G-T-T-E-G-P-R-P-Q-A-F-P-E-P-K-Q-E-S (IV).

9. Fragment de peptide selon l'une
quelconque des revendications 1 à 8 .

25 10. Procédé de préparation des peptides ou
fragments tels que définis à l'une des revendications
1 à 9 , caractérisé en ce que l'on effectue une
synthèse en phase solide en introduisant
séquentiellement sur une résine oxyméthyl polystyrène
30 réticulée les amino-acides dûment protégés en
utilisant un agent de couplage , on libère de la
résine la chaîne peptidique ainsi formée et on

déprotège les amino-acides , pour obtenir le peptide ou fragment recherché .

11. Procédé selon la revendication 10 , caractérisé en ce que la résine oxyméthyl polystyrène réticulée est une résine de type "Boc-AA-CM" dans laquelle Boc est un groupement tertibutyloxycarbonyl, AA est le premier amino-acide et CM désigne la résine oxyméthyl polystyrène réticulée.

12. Procédé selon l'une des revendications 10 et 11 , caractérisé en ce que l'agent de couplage est le BOP ou (benzotriazol-1-yloxy) tris (diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate.

13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12 , caractérisé en ce que la libération de la résine de la chaîne peptidique ainsi que la déprotection des amino-acides est effectuée au moyen de l'acide fluorhydrique en opérant à basse température .

14 . Médicaments , caractérisés en ce qu'ils sont constitués par les peptides ou fragments selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

15. Compositions pharmaceutiques , caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif , l'un au moins des peptides ou fragments selon l'une des revendications 1 à 9 .

16 . Utilisation des peptides ou fragments selon l'une des revendications 1 à 9 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'affections liés à une hypersécrétion des catécholamines ou des corticoïdes .

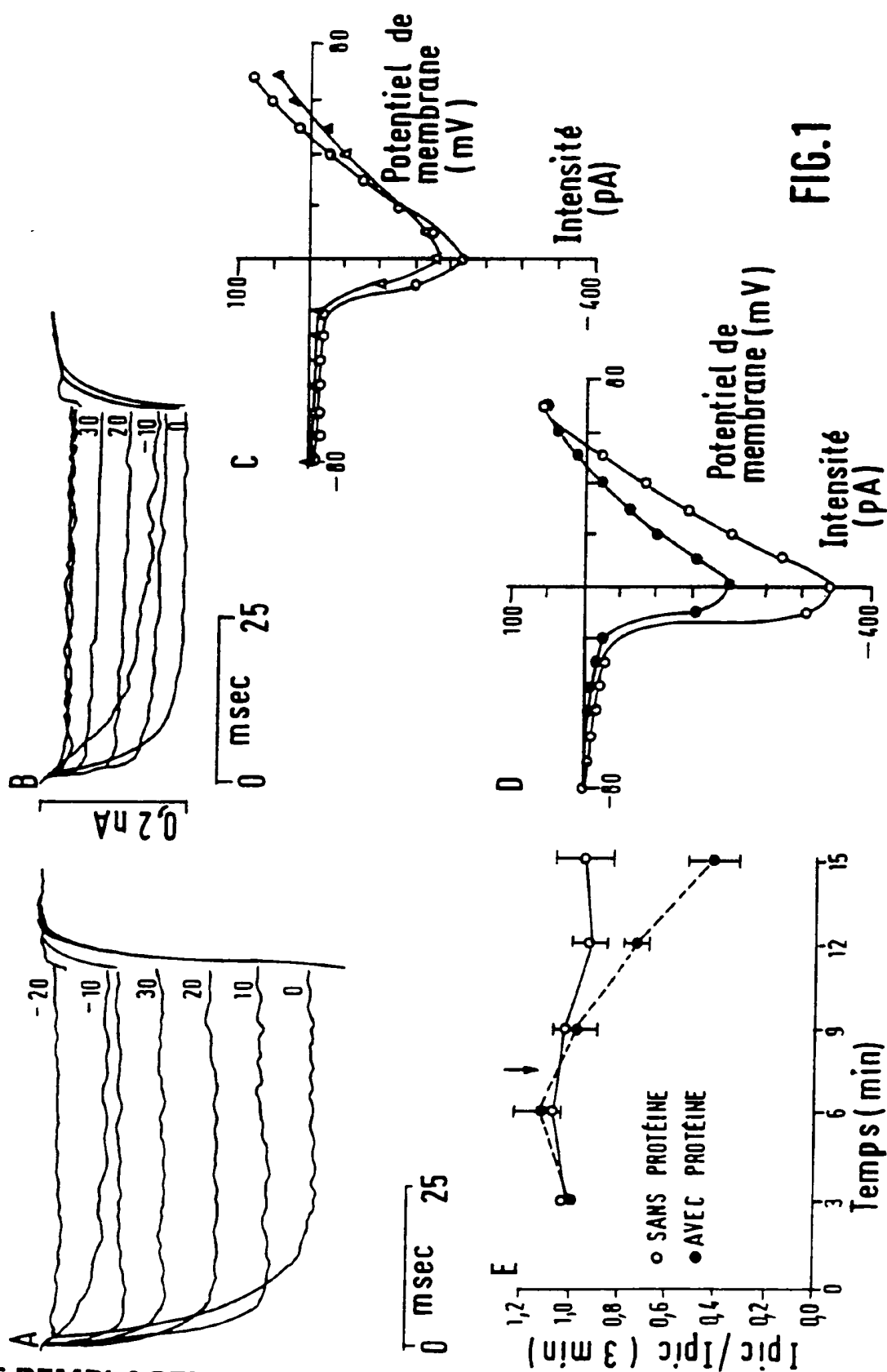
17 . Utilisation des peptides ou fragments selon l'une des revendications 1 à 9 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des

affections ou des troubles dus à une hypersécrétion de glucocorticoïdes .

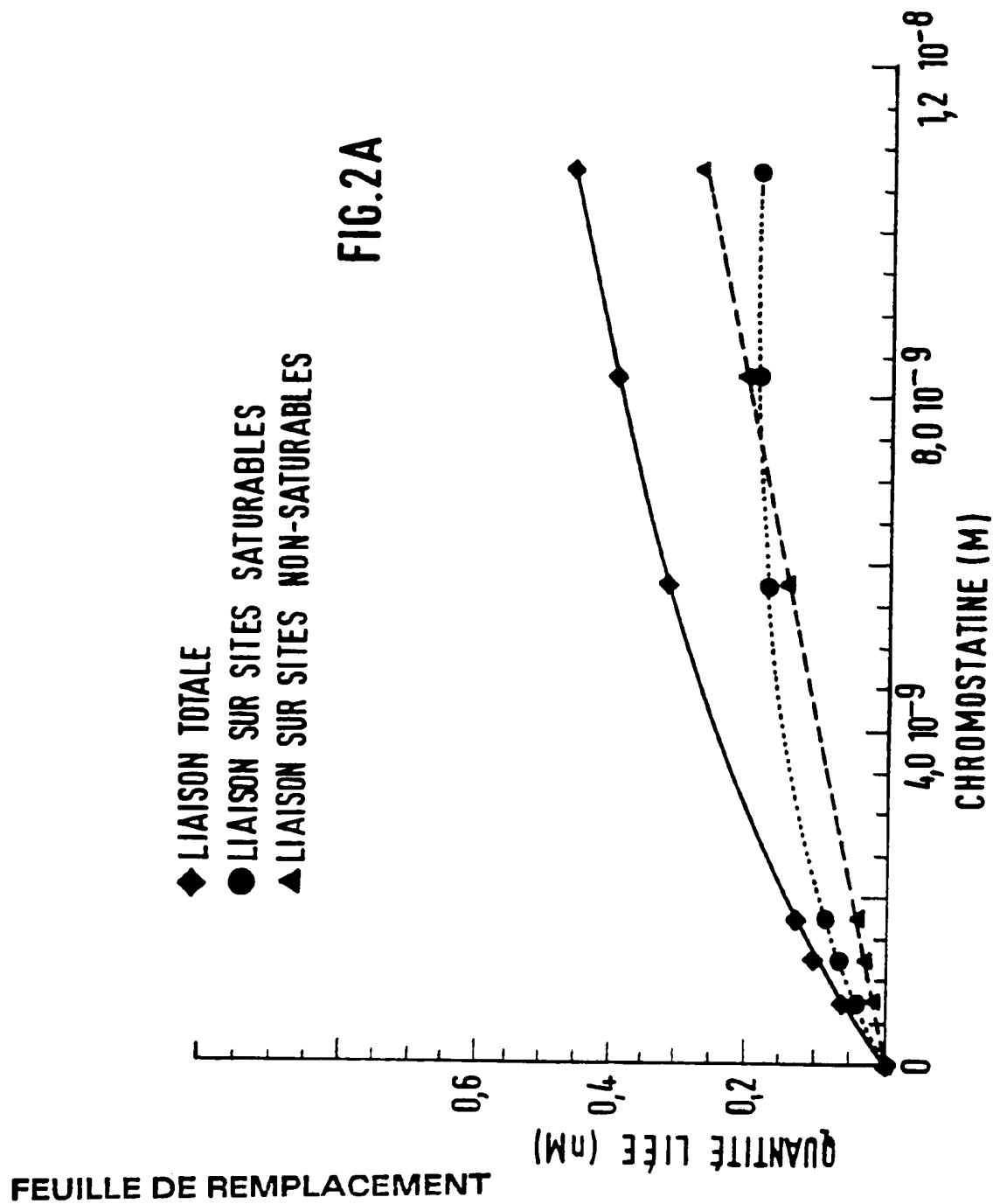
18. Utilisation des peptides ou fragments selon l'une des revendications 1 à 9 pour la
5 fabrication d'un médicament pour le traitement d'affections d'ordre cardiovasculaire.

1/6

FEUILLE DE REMPLACEMENT



2/6



3/6

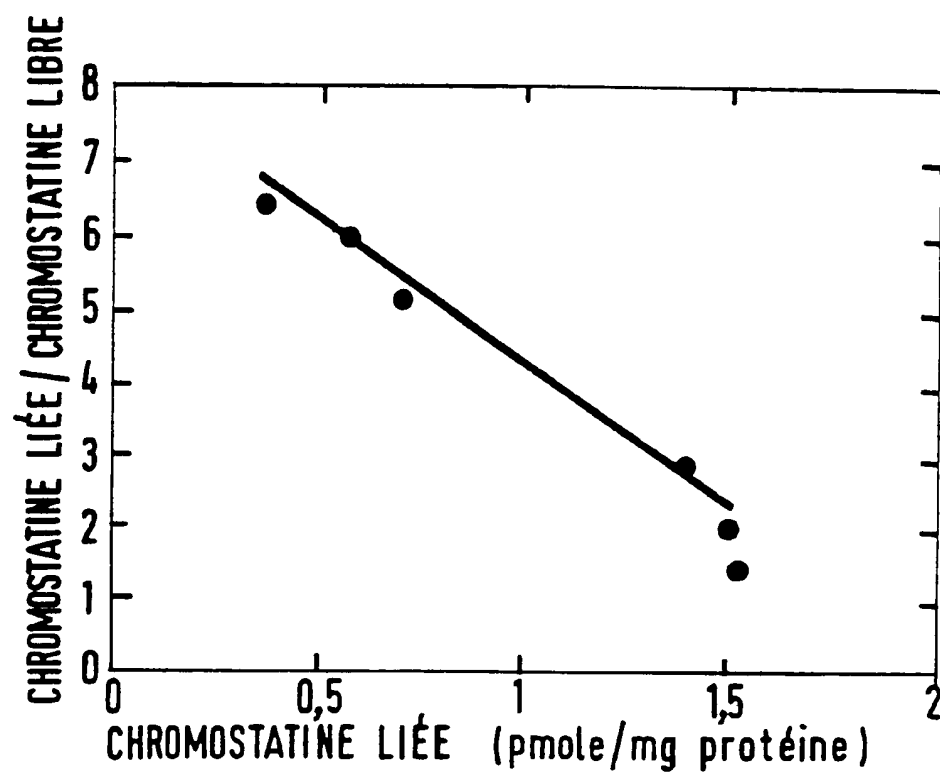


FIG.2B

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4/6

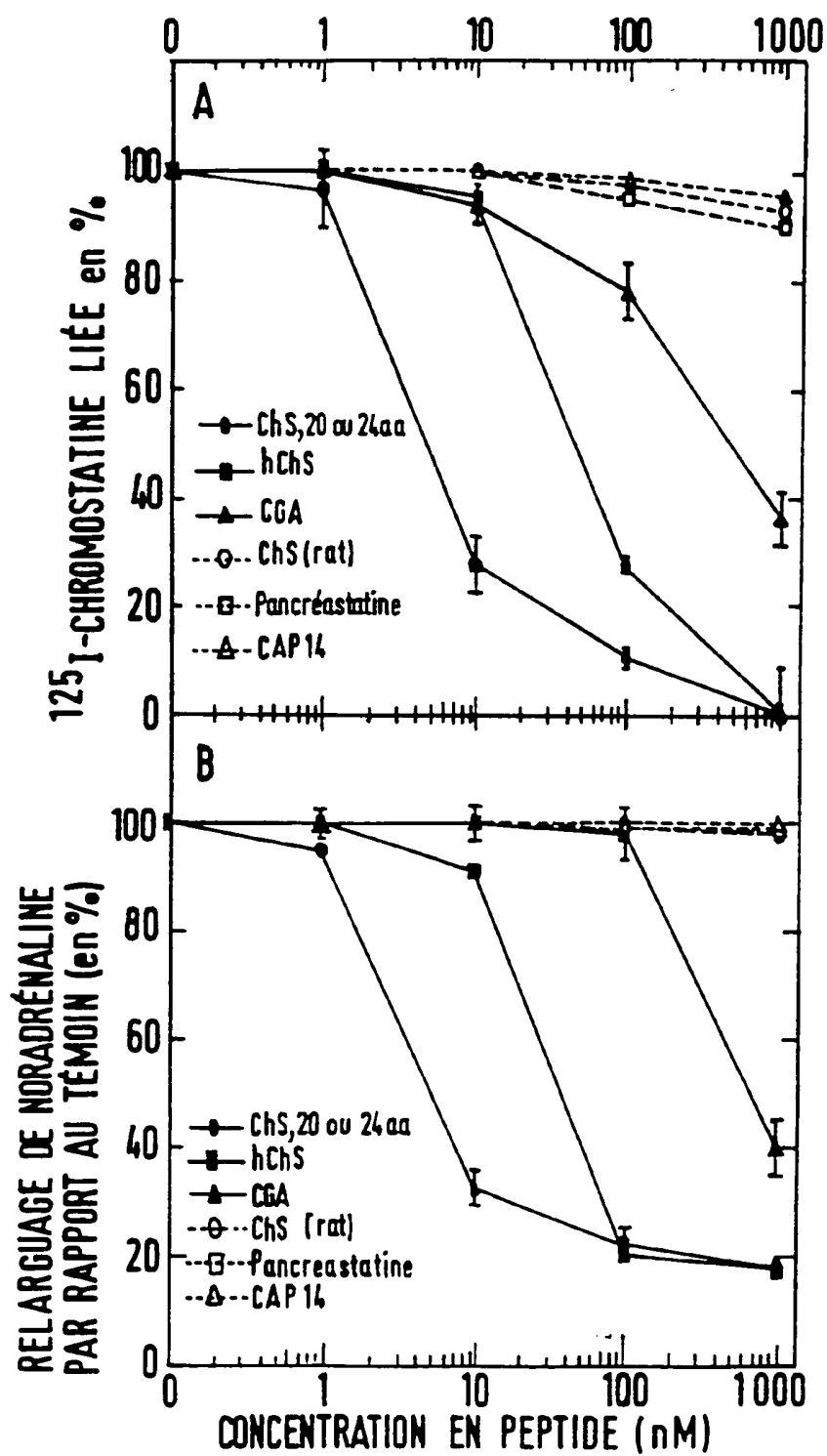


FIG.3

5/6

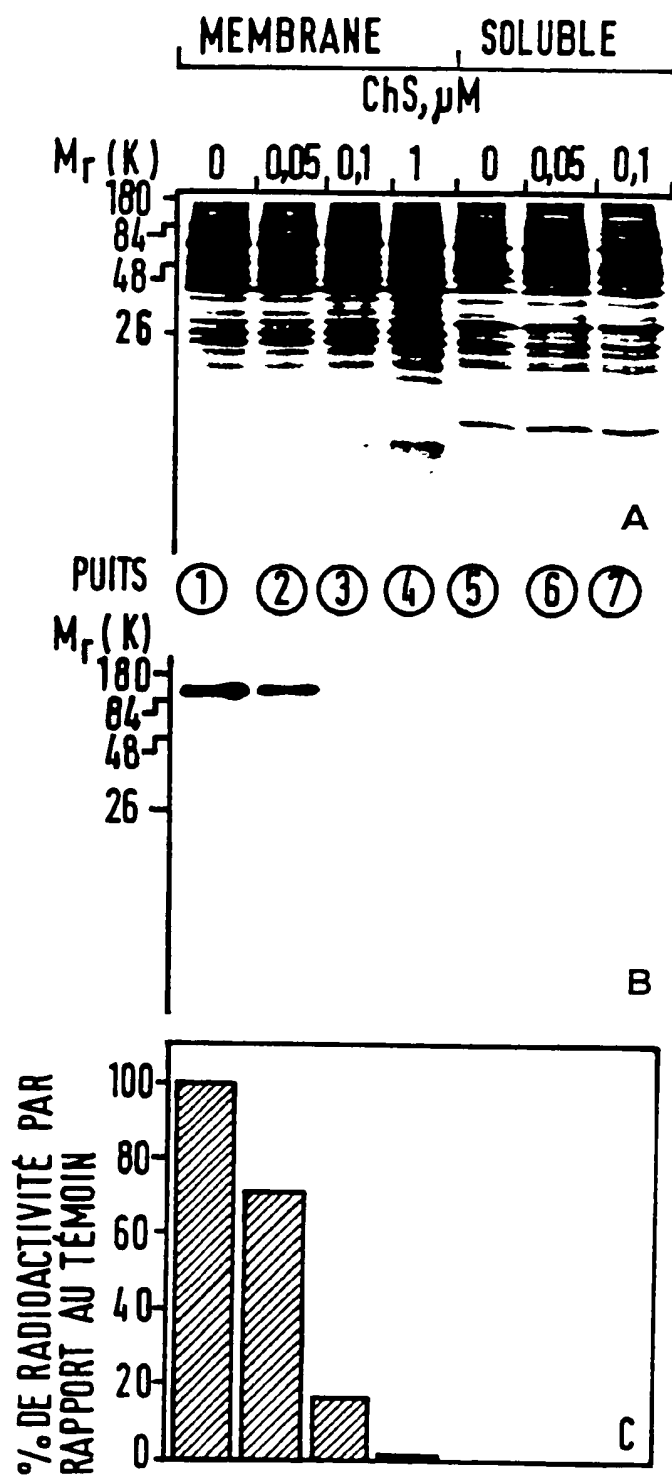


FIG.4

6/6

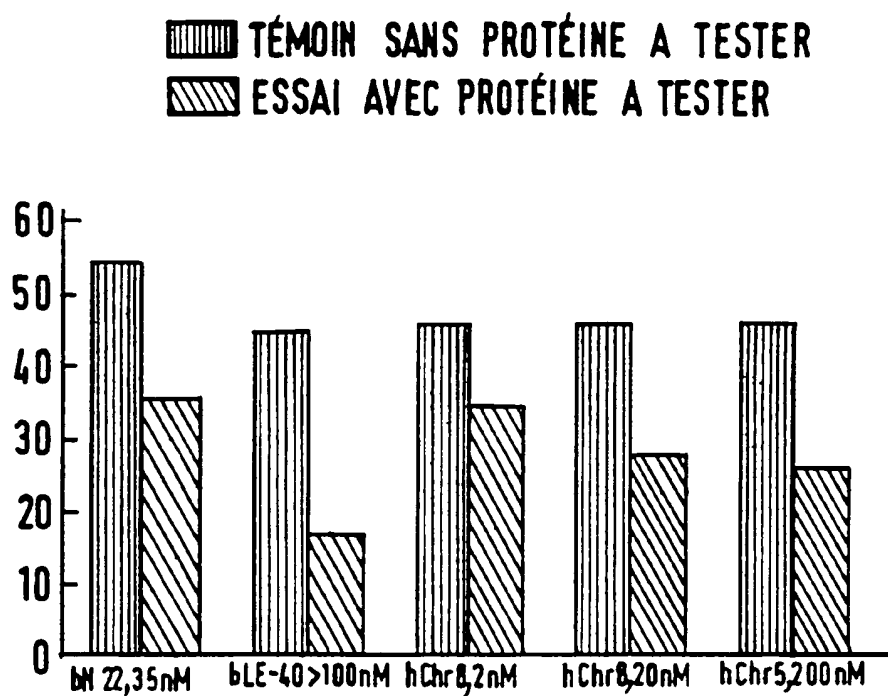


FIG.5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. **PCT/FR 91/00657**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 5px 0;"> Int.Cl.⁵ C 07 K 7/06 C 07 K 7/08 A 61 K 37/02 </div>																	
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; padding: 5px 0;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C 07 K A 61K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; padding: 5px 0;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁵	C 07 K A 61K											
Classification System	Classification Symbols																
Int.Cl. ⁵	C 07 K A 61K																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P,X</td> <td style="padding: 5px;">Proc. Natl. Acad. Sci., US, Vol. 88, 1. 11 1991, E. Galindo et al.: "Chromostatin, a 20-amino acid peptide derived from chromogranin A, inhibits chromaffin cell secretion", pages 1426 - 1430, see the whole article (cited in the application)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1,3,9-11,14</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Proc. Natl. Acad. Sci., US, Vol. 85, March 1988, Physiological Sciences, J.P. Simon et al.: "Secretion from chromaffin cells is controlled by chromagranin A-derived peptides", pages 1712-1716, see the whole article</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 164, No. 1, 1989, Academic Press, Inc., S. Funakoshi et al.: "Isolation and characterization of a tumor-derived human pancreastatin-related protein, pages 141-148, see the whole article</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1,9</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right; padding: 5px;">./.</td> </tr> </tbody> </table> <div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 5px 0; font-size: small;"> <div style="width: 45%;"> <p>⁹ Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	P,X	Proc. Natl. Acad. Sci., US, Vol. 88, 1. 11 1991, E. Galindo et al.: "Chromostatin, a 20-amino acid peptide derived from chromogranin A, inhibits chromaffin cell secretion", pages 1426 - 1430, see the whole article (cited in the application)	1,3,9-11,14	A	Proc. Natl. Acad. Sci., US, Vol. 85, March 1988, Physiological Sciences, J.P. Simon et al.: "Secretion from chromaffin cells is controlled by chromagranin A-derived peptides", pages 1712-1716, see the whole article	1,9	A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 164, No. 1, 1989, Academic Press, Inc., S. Funakoshi et al.: "Isolation and characterization of a tumor-derived human pancreastatin-related protein, pages 141-148, see the whole article	1,9	./.		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³															
P,X	Proc. Natl. Acad. Sci., US, Vol. 88, 1. 11 1991, E. Galindo et al.: "Chromostatin, a 20-amino acid peptide derived from chromogranin A, inhibits chromaffin cell secretion", pages 1426 - 1430, see the whole article (cited in the application)	1,3,9-11,14															
A	Proc. Natl. Acad. Sci., US, Vol. 85, March 1988, Physiological Sciences, J.P. Simon et al.: "Secretion from chromaffin cells is controlled by chromagranin A-derived peptides", pages 1712-1716, see the whole article	1,9															
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 164, No. 1, 1989, Academic Press, Inc., S. Funakoshi et al.: "Isolation and characterization of a tumor-derived human pancreastatin-related protein, pages 141-148, see the whole article	1,9															
./.																	
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 27 November 1991 (27.11.91) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 6 January 1992 (06.01.92) </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 27 November 1991 (27.11.91)	Date of Mailing of this International Search Report 6 January 1992 (06.01.92)	International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search 27 November 1991 (27.11.91)	Date of Mailing of this International Search Report 6 January 1992 (06.01.92)																
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer																

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	Proc. Natl. Acad. Sci., US, Vol. 84, July 1987, Medical Sciences, T.G. Ahn et al.: "Primary structure of bovine pituitary secretory protein I (chromogranin A) deduced from the cDNA sequence", pages 5043 - 5047, see the whole article	1,9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00657

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Int.C1.5 C 07 K 7/06 C 07 K 7/08 A 61 K 37/02		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
Int.C1.5	C 07 K A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
P,X	Proc. Natl. Acad. Sci., US, volume 88, 1991, E. Galindo et al.: "Chromostatin, a 20-amino acid peptide derived from chromogranin A, inhibits chromaffin cell secretion", pages 1426-1430, voir l'article en entier (cité dans la demande) ---	1,3,9-11,14
A	Proc. Natl. Acad. Sci., US, volume 85, mars 1988, Physiological Sciences, J.P. Simon et al.: "Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides", pages 1712-1716, voir l'article en entier ---	1,9
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, volume 164, no. 1, 1989, Academic Press, Inc., S. Funakoshi et al.: "Isolation and characterization of a tumor-derived human pancreastatin-related protein", pages 141-148, voir l'article en entier ---	1,9
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
27-11-1991	0 6. 01. 92	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Nicole De Bie	

II. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	Proc. Natl. Acad. Sci., US, volume 84, juillet 1987, Medical Sciences, T.G. Ahn et al.: "Primary structure of bovine pituitary secretory protein I (chromogranin A) deduced from the cDNA sequence", pages 5043-5047, voir l'article en entier -----	1,9